

Rec'd PCT/PTO 07 DEC 2004

10/516823  
PCT/JP 03/07296

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

09.06.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 6月 7日  
Date of Application:

出願番号 特願2002-167920  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 2002-167920]

REC'D 25 JUL 2003

WIPO PCT

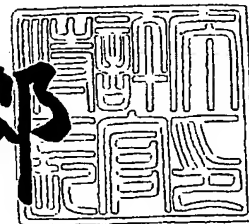
出願人 東和科学株式会社  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月 9日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 02WA001  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C07K 16/00

## 【発明者】

【住所又は居所】 広島県東広島市高屋町小谷 2 7 5 1 - 1 1 2

【氏名】 河原 明

## 【発明者】

【住所又は居所】 広島県広島市中区舟入町 6 番 5 号 東和科学株式会社内

【氏名】 三井 直子

## 【特許出願人】

【識別番号】 000223104

【氏名又は名称】 東和科学株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100104215

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 大森 純一

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100104411

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 矢口 太郎

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 069085

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 検出キット、それに用いられる測定プレート、検出方法、評価方法、カエルビテロジェニンのポリクローナル抗体及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料が注入される有底の穴を有するプレート本体と、前記穴の表面に固相化され、カエルビテロジェニンを認識する1次抗体とを有する測定プレートと、

前記1次抗体が固相化された穴に注入される標準カエルビテロジェニンと、  
前記試料又は前記標品が注入された穴に注入され、前記カエルビテロジェニンを認識する2次抗体と

を具備することを特徴とする検出キット。

【請求項2】 前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることを特徴とする請求項1に記載の検出キット。

【請求項3】 前記2次抗体が、標識化合物により標識されていることを特徴とする請求項1に記載の検出キット。

【請求項4】 前記1次抗体は、前記穴の表面に吸着し、ブロッキング剤で前記穴の表面がブロックされていることを特徴とする請求項1に記載の検出キット。

【請求項5】 試料と、カエルビテロジェニンを認識し、標識化合物により標識された抗体が注入、混合される有底の穴を有する第1のプレートと、

前記試料と抗体の混合液が注入される有底の穴を有する第2のプレート本体と

、  
前記第2のプレートの穴の表面に抗原として固相化された標準カエルビテロジェニンと

を具備することを特徴とする検出キット。

【請求項6】 前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることを特徴とする請求項5に記載の検出キット。

【請求項7】 前記抗原は、前記第2のプレート穴の表面に固相化され、ブロッキング剤でブロックされていることを特徴とする請求項5に記載の検出キット

。 【請求項 8】 試料が注入される有底の穴を有するプレート本体と、前記穴の表面に固相化され、カエルビテロジェニンを認識する 1 次抗体と、を具備することを特徴とする測定プレート。

【請求項 9】 試料と、カエルビテロジェニンを認識し、標識化合物により標識された抗体との混合物が注入される有底の穴を有するプレート本体と、前記プレートの穴の表面に固相化された抗原としてのカエルビテロジェニンとを具備することを特徴とする測定プレート

【請求項 10】 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の検出キットを用いてカエルビテロジェニンを検出することを特徴とする検出方法。

【請求項 11】 試料と、前記試料中に含まれるビテロジェニンを認識する 1 次抗体とを反応させる工程と、

前記試料中に含まれるビテロジェニンと前記抗体の複合体に、前記ビテロジェニンを認識する 2 次抗体とを反応させる工程と、  
を具備することを特徴とする検出方法。

【請求項 12】 前記 2 次抗体は標識化合物により標識化されていることを特徴とする請求項 11 に記載の検出方法。

【請求項 13】 前記複合体と結合した 2 次抗体と発色剤とを直接あるいは間接的に反応させて、その発色反応に基づき前記検体中のビテロジェニン量を測定する工程を更に具備することを特徴とする請求項 11 又は 12 に記載の検出方法。

。

【請求項 14】 試料と、標識化合物により標識化され、前記試料中に含まれるビテロジェニンを認識する抗体とを反応させて複合体を得る工程と

前記複合体とビテロジェニンとを拮抗反応させる工程と  
を具備することを特徴とする検出方法。

【請求項 15】 前記拮抗反応により得られた反応生成物と発色剤とを反応させて、その発色反応に基づき前記検体中のビテロジェニン量を測定する工程を更に具備することを特徴とする請求項 14 に記載の検出方法。

【請求項 16】 試料と、前記試料中に含まれるビテロジェニンを認識する抗

体とを反応させる工程と、

前記試料中に含まれるビテロジェニンと前記抗体の複合体に、標識化合物により標識され、前記ビテロジェニンを認識する 2 次抗体とを反応させる工程と、

前記複合体と結合した 2 次抗体の標識と発色剤とを反応させて、該発色量を測定する工程と、

前記発色量からビテロジェニン量を算出し、該ビテロジェニン量に基づいて評価する工程と

を具備することを特徴とする評価方法。

【請求項 17】 前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることを特徴とする請求項 16 に記載の環境評価方法。

【請求項 18】 試料と、標識化合物により標識化され、前記試料中に含まれるカエルビテロジェニンを認識する抗体とを反応させて複合体を得る工程と、

前記複合体とビテロジェニンとを拮抗反応させる工程と、

前記拮抗反応により得られた反応生成物と発色剤とを反応させて、その発色反応に基づき前記検体中のビテロジェニン量を算出し、該ビテロジェニン量に基づいて評価する工程と

を具備することを特徴とする評価方法。

【請求項 19】 前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることを特徴とする請求項 18 に記載の評価方法。

【請求項 20】 哺乳動物にカエルビテロジェニンを抗原として免疫し、前記免疫した哺乳動物から抗血清を採取し、前記抗血清から IgG として単離することにより得られることを特徴とするカエルビテロジェニンのポリクローナル抗体。

【請求項 21】 哺乳動物にカエルビテロジェニンを抗原として免疫して採取した抗血清から得られる IgG をアフィニティカラムを用いて精製することにより得ることを特徴とするカエルビテロジェニン抗体の製造方法

【請求項 22】 前記アフィニティカラムが雄カエル血清タンパク質と結合していることを特徴とする請求項 21 に記載のカエルビテロジェニン抗体の製造方法。

【請求項 23】 前記アフィニティカラムがカエルピテロジェニンと結合していることを特徴とする請求項 22 に記載のカエルピテロジェニン抗体の製造方法。

【請求項 24】 両生類に由来する肝細胞を培養する工程と、  
前記肝細胞に対し試料を投与する工程と、  
前記培養肝細胞の試料に対する応答を検出する工程と、  
を具備した評価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、カエルピテロジェニンを使って環境を評価する技術の分野に属するものである。また、本発明は、特にカエルピテロジェニンの検出キット、測定プレート、ピテロジェニンの検出方法、評価方法及びカエルピテロジェニンのポリクローナル抗体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、ヒトをはじめとする生体及び生態系に対する様々な化学物質の影響が問題となっている。

【0003】

中でも、生体の内分泌系を攪乱し、その恒常性を阻害する「内分泌攪乱化学物質」、通称、環境ホルモンの影響が深刻化している。

【0004】

内分泌攪乱化学物質（以下、環境ホルモンとも言う）は、本来生体が備えているホルモンと類似の作用、あるいはその作用の阻害等を引き起こし、それにより生体に対して異常をひき起こすと考えられている。内分泌攪乱化学物質の作用点として、例えば、ホルモンレセプターとの結合、ホルモン（リガンド）との結合、ホルモンの生体内での合成、ホルモンの代謝等の局面が指摘されているが、生体に対する内分泌攪乱化学物質の作用機序は多岐に亘ることから、現在までのところ、内分泌攪乱化学物質による内分泌攪乱作用のメカニズムについては明確に

把握されていない。

#### 【0005】

ところで、内分泌攪乱化学物質の生体に対する影響は、専ら、形態異常や行動異常を指標として確認されてきた。しかしながら、形態異常や行動異常を指標とした場合、これらは定量化が困難であり、かつ感度・精度も低いことから、化学物質の作用を形態異常や行動異常により見積もるのは危険が大きく、また困難である。そこで、形態異常や行動異常といった、生体の表現系に異常が生じる以前に、定量性をもって、化学物質あるいは環境の生体に対する作用を評価するための分子マーカーが求められている。

#### 【0006】

このような特性を備えた分子マーカーの一つとして、産卵性動物の卵黄蛋白前駆体であるビテロジェニンが注目されている。ビテロジェニンは通常雌個体の肝臓で繁殖期に活発に合成されるものであり、雄の血中にはビテロジェニンは通常検出されないか元々存在しない。このような特性から、ビテロジェニンは、高感度で、かつ定量性をもって化学物質あるいは環境の内分泌攪乱作用を評価できるマーカーとして注目されているのである。

#### 【0007】

このビテロジェニンを検出するため、例えば特開平2001-218582、2001-122899、2000-125867等ではコイ、メダカ等の魚類のビテロジェニン検出方法等についての記載があり、実際にこれらビテロジェニンの検出キットも実用化されている。

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、化学物質の生態系全体に対する影響を把握し対処するためには、魚類のみならず、様々な栄養段階、系統進化段階に位置する生物について、化学物質の効果を正当に調査し評価しなくてはならない。

#### 【0009】

また、ビテロジェニンの構造は非常に複雑であり、また種によってかなり多様化しているため、特定の種に対して構成された既存の検査キットにより、他種に

由来するビテロジェニンを測定することは非常に困難である。

#### 【0010】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、両生類、特にカエルのビテロジェニンを定量性に優れ、かつ高感度に検出し、化学物質あるいは環境評価を精度よく行うための技術を提供することを目的とする。

#### 【0011】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、以下に示す手段により上記目的を達成した。

#### 【0012】

すなわち、本発明のカエルビテロジェニンの検出キットは、試料が注入される有底の穴を有するプレート本体と、前記穴の表面に固相化され、カエルビテロジェニンを認識する1次抗体とを有する測定プレートと、前記1次抗体が固相化された穴に注入される標準カエルビテロジェニンと、前記試料又は前記標品が注入された穴に注入され、前記カエルビテロジェニンを認識する2次抗体とを具備することを特徴とする。

#### 【0013】

また、別の観点によれば本発明の他の形態に係る検出キットは試料が注入される有底の穴を有するプレート本体と、前記穴の表面に固相化され、カエルビテロジェニンを認識する1次抗体と、前記1次抗体が固相化された穴に注入される標準カエルビテロジェニンと、前記試料又は前記標品が注入された穴に注入され、前記カエルビテロジェニンを認識する2次抗体とを具備することを特徴とする。

#### 【0014】

ここで、環境とは、環境中に存在する化学物質、又は該化学物質により汚染された環境を指す。

#### 【0015】

また、ここで言う試料とはカエルの血漿もしくは血清、組織及び細胞等である。本発明に用いることができるカエルの例としては、例えば、アカガエル (*Rana japonica*)、トノサマガエル (*Rana nigromaculata*)、



lata)、ツチガエル (*Rana rugosa*)、ヒメアマガエル (*Microhyla ornata*)、スズガエル (*Bombina bombina*) 及びアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)、(*Xenopus tropicalis*) 等を用いることができる。これらの中でも、アフリカツメガエルを用いた場合には、季節を問わず大量の卵ひいては成体を得ることができ個体の維持も容易であることから好ましい。

#### 【0016】

本発明では、上記のような構成により、迅速且つ容易にカエルビテロジェニンを検出することが可能となる。

#### 【0017】

本発明では、特に、カエルビテロジェニンを認識する1次抗体がプレートの穴表面に固相化されているため、例えば後述する本発明の検出方法に係るサンドイッチ酵素免疫法でビテロジェニンを検出することが可能となる。

#### 【0018】

従来のビテロジェニン検出キットは、魚類のみを対象としたものであったが、本発明によればカエルを始めとする両生類のビテロジェニンを精度良く測定することができるので、これらの種における化学物質等の評価を正当に行うことが可能となる。

#### 【0019】

また、カエルは産卵性動物でもあり、発生過程における養分を担保するために卵内に大量の卵黄タンパク質を蓄積する。ビテロジェニンは、この卵黄タンパク質の前駆体であり、通常ならば雌個体の肝臓で合成されるものであり、雄には存在しない。しかしながら、エストロゲン等に曝露された雄個体の場合には、本来合成されることのないビテロジェニンの合成が肝臓で行われることから、該ビテロジェニンは、内分泌攪乱化学物質による内分泌攪乱作用メカニズムが不明であっても、環境における内分泌攪乱性を感度良く評価できるマーカーとして有効である。

#### 【0020】

また、カエルの生活環は水陸双方の環境に亘っているので、河川、湖沼、地下

水などの水系若しくは周辺土壌の化学物質等に曝されるだけでなく、大気中の化学物質等にも曝されるという特徴がある。このため、野生生物に対する環境ホルモン等の化学物質の影響を評価する上で、カエルを利用する利点は大きい。

【0021】

また、前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることを特徴とする。

【0022】

本発明の検出キットに用いられる試料としては、野生若しくは環境に一定期間曝露したカエル、あるいは実験室内で化学物質に曝露したカエル等の血漿もしくは血清又はある種の組織若しくは細胞に由来した試料を用いることができる。

【0023】

これらを試料として用いることにより、検出精度を向上させることが可能となる。

【0024】

また、プレートは、複数の穴を設けていることが好ましく、種々の公知のプレートを使用することができる。穴が複数あることにより様々な試料を同時に処理することができるので、処理効率が向上する。

【0025】

また、穴表面に抗体が固相化されているため、試料を分注することで速やかに抗原抗体反応がおこり、迅速な処理を行うことができる。

【0026】

また、前記2次抗体が、標識化合物により標識されていることを特徴とする。

【0027】

ここで、標識化合物とは、例えばHRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）等の酵素や、ビオチン等をいう。

【0028】

これにより、2次抗体あるいは2次抗体および2次抗体を認識する酵素標識検出体をプレート注入後発色剤と反応させることにより該標識酵素が発色し、この発色量を吸光度測定することによりピテロジェニン量を定量することができる。

【0029】

前記1次抗体は、前記穴表面に吸着し固相化され、ブロッキング剤でブロッキングされていることを特徴とする。

#### 【0030】

これにより固相化された1次抗体は、確実に固定されるため、検出結果の信頼性も向上する。

#### 【0031】

また、本発明の別の形態に係る検出キットは、試料と、カエルピテロジェニンを認識し、標識化合物により標識された抗体が注入、混合される有底の穴を有する第1のプレートと、前記試料と抗体の混合液が注入される有底の穴を有する第2のプレート本体と、前記第2のプレートの穴の表面に抗原として固相化された標準カエルピテロジェニンとを具備することを特徴とする。

#### 【0032】

このような構成によれば、酵素免疫法の中でも特に拮抗法に好適なキットとなり、この方法により効率良く処理を行い、適正な結果を得ることができる。

#### 【0033】

また、前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることが好ましい。これにより効率良くピテロジェニンを検出することができる。

#### 【0034】

また、前記抗原は、前記穴表面に吸着し固相化され、ブロッキング剤でブロッキングされていることを特徴とする。

#### 【0035】

これにより非特異的抗体の結合が排除されているため、評価の信頼性も向上する。

#### 【0036】

本発明の測定プレートは、試料が注入される有底の穴を有するプレート本体と、前記穴の表面に固相化され、カエルピテロジェニンを認識する1次抗体とを具備することを特徴とする。

#### 【0037】

このような構成によれば、サンドイッチ法に係る検出キットの測定プレートと

して用いることによりカエルビテロジェニンを効率良く検出することができる。

#### 【0038】

すなわち、プレート表面に予め抗体を固相化しているため、ここに試料を分注するだけで速やかに抗原抗体反応を得ることが可能となる。また、処理毎にプレートに抗体を固相化する必要もないので、結果のばらつきを防止することが可能となる。

#### 【0039】

また、本発明の別の形態に係る測定プレートは、試料とカエルビテロジェニンを認識し、標識化合物により標識された抗体との混合物が注入される有底の穴を有するプレート本体と。前記プレートの穴の表面に固相化された抗原としてのカエルビテロジェニンとを具備することを特徴とする。

#### 【0040】

このような構成によれば、この場合プレート表面には抗原を固相化しているため、拮抗法に係る検出キットの測定プレートとして用いることができ、それによりカエルビテロジェニンを効率良く検出することができる。

#### 【0041】

本発明の検出方法は、上述した検出キットを用いてカエルビテロジェニンを検出することを特徴とする。

#### 【0042】

このような構成によれば感度の良い検出キットを用いることができるので、検出の信頼性が向上する。

#### 【0043】

また、別の形態に係るカエルビテロジェニンの検出方法は、試料と、前記試料中に含まれるビテロジェニンを認識する抗体とを反応させる工程と、前記試料中に含まれるビテロジェニンと前記抗体の複合体に、標識化合物により標識され、前記ビテロジェニンを認識する2次抗体とを反応させる工程とを具備することを特徴とする。

#### 【0044】

このような構成によれば、酵素免疫法を用いてビテロジェニンを検出するので

、検出精度も向上し、処理時間の短縮も可能となる。特に、本発明の検出方法は、サンドイッチ法に好適な方法であり、ビテロジェニンの検出感度を向上させることができる。

【0045】

また、前記複合体と結合した2次抗体と発色剤とを反応させて、その発色反応に基づき前記検体中のビテロジェニン量を測定する工程を更に具備することを特徴とする。

【0046】

これにより、サンドイッチ法により標識されたビテロジェニンを確実に定量することが可能となる。

【0047】

また、本発明のカエルビテロジェニンの検出方法に係る別の形態としては、試料と、酵素により標識され前記試料中に含まれるビテロジェニンを認識する抗体とを反応させて複合体を得る工程と前記複合体とビテロジェニンとを拮抗反応させる工程とを具備することを特徴とする。

【0048】

本形態に係る検出方法は、拮抗法であり、このような構成によりビテロジェニンの検出感度を試料の形態に応じて向上させることが可能となる。

【0049】

また、前記拮抗反応により得られた反応生成物と発色剤とを反応させて、その発色反応に基づき前記検体中のビテロジェニン量を測定する工程を更に具備することを特徴とする。

【0050】

これにより、拮抗反応により検出されたビテロジェニンを確実に定量することが可能となる。

【0051】

このように、本発明の検出方法は、いわゆる酵素免疫法（ELISA法）であり、サンドイッチ法、拮抗法いずれの方法であっても好適に行うことができる。

【0052】

これにより、様々な試料を用いる場合でも、試料形態にあわせた感度の良い酵素免疫法を用いることが可能となる。

【0053】

また、該検出方法で用いられる抗体は、ポリクローナル抗体であっても良く、モノクローナル抗体であっても良い。

【0054】

また、前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることが好ましい。これにより検出精度が向上する。

【0055】

本発明の評価方法は、試料と、前記試料中に含まれるビテロジェニンを認識する抗体とを反応させる工程と、前記試料中に含まれるビテロジェニンと前記抗体の複合体に、標識化合物により標識され、前記ビテロジェニンを認識する2次抗体とを反応させる工程と、前記複合体と結合した2次抗体の標識酵素と発色剤とを反応させて、該発色量を測定する工程と、前記発色量からビテロジェニン量を算出し、該ビテロジェニン量に基づいて環境を評価する工程とを具備することを特徴とする。

【0056】

このような構成によれば、サンドイッチ法に基づいて、的確な環境評価を行なうことが可能となる。

【0057】

また、前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることが好ましい。

【0058】

また、本発明に係る別の形態の評価方法は、試料と、標識化合物により標識され、前記試料中に含まれるビテロジェニンを認識する抗体とを反応させて複合体を得る工程と、前記複合体とビテロジェニンとを拮抗反応させる工程と、前記拮抗反応により得られた反応生成物と発色剤とを反応させて、その発色反応に基づき前記検体中のビテロジェニン量を算出し、該ビテロジェニン量に基づいて環境を評価する工程とを具備することを特徴とする。

【0059】

また、本形態においても、前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることが好ましい。

#### 【0060】

このような構成によれば、拮抗法に基づいて、精度よく環境評価を行なうことができる。

#### 【0061】

また、上述したように、本発明の評価方法は酵素免疫法におけるサンドイッチ法又は拮抗法両方を適宜用いることができるため、様々な試料形態に対応して評価を行なうことが可能となる。

#### 【0062】

本発明のカエルビテロジェニンのポリクローナル抗体は、哺乳動物にカエルビテロジェニン抗原として免疫し、前記免疫した哺乳動物から抗血清を採取し、前記抗血清からIgGとして単離することにより得られることを特徴とする。

#### 【0063】

このようにして得られた抗体を用いることにより、特異的且つ高感度にカエルビテロジェニンを検出し、適切な環境評価を行うことが可能となる。

#### 【0064】

本発明のポリクローナル抗体の製造方法は、哺乳動物にカエルビテロジェニンを抗原として免疫して採取した抗血清から得られるIgGを、アフィニティカラムを用いて精製することにより得られることを特徴とする。

#### 【0065】

また、前記アフィニティカラムが雄カエル血清タンパク質と結合していることを特徴とする。

#### 【0066】

また、前記アフィニティカラムがカエルビテロジェニンと結合していることを特徴とする。

#### 【0067】

このような構成とすることにより、抗体そのものの結合特異性も向上するため、それにより検出、評価方法の精度も向上することができる。

**【0068】**

本発明の別の形態に係る評価方法は、(両生類)に由来する肝細胞を培養する工程と、前記肝細胞に対し試料を投与する工程と、前記培養肝細胞の試料に対する応答を検出する工程とを具備することを特徴とする。

**【0069】**

ここで、用いられる肝細胞は成体および幼生をはじめとする両生類のものをしていることができる。

**【0070】**

また、評価試料とは、種々の化学物質や、例えば河川の水、工場廃水、下水処理場の処理水若しくは土壌の抽出成分等の環境試料をさす。

**【0071】**

このような構成によれば、肝細胞を用いて、多数の試料に対して、経済的、迅速かつ簡便に、生体内のホルモン等に影響されず、肝細胞の応答が直接検定でき、厳密な曝露条件設定も可能となる。

**【0072】**

本発明の別の形態に係る検出方法は、前記検出キットを用いてビテロジェニンを検出することを特徴とする。

**【0073】**

ここで、応答とは、主にビテロジェニンの合成誘導を指すが、この他にもトランスフェリンやアルブミン等の誘導を指標とすることにより、他の環境ホルモンに属する化学物質の作用等を多面的に評価することが可能である。

**【0074】****【発明の実施の形態】**

以下、本発明の実施の形態を説明する。

**【0075】**

まず、検出キットについて説明する。この検出キットは酵素免疫法(ELISA法)を用いてカエルビテロジェニンを精度良く検出するものであり、ELISA法の中でもサンドイッチ法及び拮抗法のどちらに対しても対応できるようになっている。



## 【0076】

まず、サンドイッチELISA法を用いてカエルビテロジェニンを検出する検出キットを図に基づいて説明する。図1は本実施形態に係るビテロジェニンの検出キット1全体の構成を模式的に示す図である。

## 【0077】

ここで、検出キット1の構成としては、試料が注入されるビテロジェニンを認識する1次抗体12を固相化してある有底の穴101を有するプレート10と、標品としての参照用カエルビテロジェニン11と、酵素やビオチン等により標識された2次抗体13とが含まれている。

## 【0078】

また、これらの他に、試料を希釈する検体希釈液14、抗体を希釈する抗体希釈液15、2次抗体13の標識の発色反応を行うための基質溶液と発色剤16、処理中の液を安定させるための緩衝液17、過剰反応を抑制する反応停止液18あるいは所定時にプレートを洗浄するための洗浄液19等、通常のELISA法に用いられる試薬等が含まれている。

## 【0079】

検出キット1ではこのような構成により、プレート10の穴101に、環境に曝露されたカエルから採取した試料を注入し、試料に含まれているビテロジェニンと、標品11、1次抗体12及び2次抗体13との抗原抗体反応を行い、それをELISA法に基づいて検出することにより、感度良くビテロジェニンを検出することができる。

## 【0080】

ここで、検出キット1に用いられる試料としては、野生若しくは環境に一定期間曝露したカエル、あるいは実験室内で化学物質に曝露したカエル等の体液又は組織若しくは細胞に由来した試料を用いることができる。好ましくは、後述するようにカエルの血漿、肝臓のホモジネート、初代培養肝細胞が良い。ビテロジェニンは、肝臓で合成され、血液にて運ばれるため、これらを試料とすることにより、精度よくビテロジェニンの検出を行うことができる。

## 【0081】

また、前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることが好ましい。また、培養肝細胞であることが好ましい。

【0082】

組織の場合は肝臓ホモジネートであることが好ましく、また細胞の場合には初代培養肝細胞であることが好ましい。

【0083】

これにより、カエル体内のピテロジェニンの検出感度を向上させることが可能となる。

【0084】

また、これら試料、1次抗体、2次抗体及び標品ピテロジェニンは、上述した緩衝液で希釈して処理を行うようになっている。

【0085】

また、2次抗体の標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）やビオチン等が好ましいが、その他従来公知の標識を種々用いることができる。

【0086】

図2は本実施形態に係る検出キット1のプレート10の模式図である。

【0087】

図2に示すように、この検出キットのプレート10には、試料を注入するための穴101が複数設けられている。ここでは例えば1列当り8個の穴を設けたプレートが12個つながることにより96穴設けられており、この穴101内で一連の処理が行われるようになっている。この穴の部分断面図を図3に示す。

【0088】

穴101の表面は、ここでは後述する検出方法のうちサンドイッチ法を用いることにより、予め抗体を固相化するようになっている。図3では例として1次抗体111が固相化されている状態を示している。

【0089】

次に拮抗法に用いられる検出キットの構成について概要を説明する。キットとして用いられる試薬等はほぼサンドイッチ法と同じであるが、図4に示すように、拮抗法では、プレート20の穴201には抗原としてカエルピテロジェニン2

11が固相化されており、さらに別のプレート（図示せず）で、予め試料と標識された抗体とを混合させておき、この混合物をプレート20に注入し、その反応を測定することによりビテロジェニンを検出できるようになっている。

#### 【0090】

このように、本実施形態に係る検出キットを用いることにより、試料中に含まれるビテロジェニンの量が低濃度であっても、高感度に検出することが可能となり、それにより緻密な環境評価を行うことが可能となる。また、予め抗原若しくは抗体を固相化しておくことにより、利便性も向上し、処理も迅速化することができ、更には得られる結果の信頼性も向上させることができる。

#### 【0091】

従来のビテロジェニンを検出するためのキットはメダカやコイ等魚類のビテロジェニンの検出に限られており、魚類以上の体制を有する高等生物に対応できなかったが、この検出キットによれば、カエルという両生類のビテロジェニンを検出することが可能となり、網羅的に環境を評価することができる。

#### 【0092】

次に、カエルビテロジェニンの検出方法について説明する。

#### 【0093】

本実施形態に係る検出方法は、上述した検出キットを用いて行うものであり、酵素免疫法、すなわちELISA法に基づきビテロジェニンを検出する方法である。

#### 【0094】

ここで、ELISA法ではサンドイッチ法及び拮抗法という2つの方法が知られているが、この検出方法ではそのどちらの方法にも対応している。

#### 【0095】

以下、各方法における工程を図に基づき説明する。図4は拮抗法による検出方法の工程を説明する工程図である。図5はサンドイッチ法による検出方法の工程を説明する工程図である。

#### 【0096】

拮抗法

まず、固相抗原として標品の固相化を行う。標品ピテロジェニンを希釈してマイクロプレートに分注して、インキュベーションし（ステップ401）固相化を行う。所定時間経過した後にプレートを洗浄し（ステップ402）、ブロッキング剤を分注してプレート穴表面のブロッキングを行う（ステップ403）。その後余分な薬剤を除去するためプレート洗浄を行う（ステップ404）。

#### 【0097】

この固相化を行っている時に平行して、別のプレートでHRP標識抗体と環境に曝露した検体試料（若しくは抗原）を混合し（ステップ4001）、インキュベーションする（ステップ4002）。このようにして得られた抗原抗体複合体を固相化抗原プレートに分注して拮抗反応させる（ステップ405）。次いでプレートを洗浄し（ステップ406）、その後発色基質を注入して発色反応させる（ステップ407）。反応が終わるとマイクロリーダー等で吸光度を測定し（ステップ408）、その値からピテロジェニン量を算出する（ステップ409）。

#### 【0098】

##### サンドイッチ法

マイクロプレートの各穴に1次抗体の希釈液を分注し、所定時間インキュベーションする（ステップ501）。その後プレートを洗浄し（ステップ502）、ブロッキング剤を分注して固相化する（ステップ503）、次いで、環境に曝露した検体試料若しくは標品ピテロジェニン（希釈液）を分注して、反応する（ステップ504）。その後、プレートを洗浄し（ステップ505）、次いで2次抗体を分注、反応させる（ステップ506）。次いでプレートを洗浄し（ステップ507）、その後発色基質を分注して発色反応させる（ステップ508）。発色反応後、マイクロリーダー等により吸光度を測定し（ステップ509）、その結果に基づきピテロジェニン量を算出する（ステップ510）。

#### 【0099】

上述したように、この検出方法では2通りの検出方法を用いることが可能であり、様々な検体を用いることができる。また、これにより検出感度も向上させることができる。

#### 【0100】

次に、環境評価方法について説明する。

#### 【0101】

本実施形態に係る環境評価方法は、上述した検出キットと検出方法を用いることにより、従来検出できなかったカエルビテロジェニンを用いることを可能として環境中の環境ホルモン等内分泌攪乱性化学物質及び種々の化学物質の影響を評価するものである。

#### 【0102】

現在実用化されているビテロジェニン検出キットとしてはメダカやコイ等の魚類に対応したものしかなく、魚類以外の生物を含めた網羅的な環境評価ができないという不具合があったが、本発明の環境評価方法ではカエルを用いているため、カエルから検出されるビテロジェニン量に基づいて、網羅的に環境を評価できるという利点がある。

#### 【0103】

ここで、検体として用いるカエルを環境に曝露する方法としては、飼育水への対象物質の添加や、各個体への直接注入等の方法が用いられる。また、野生に存在しているカエルを採取して、そこから試料を得ることにより、容易且つ高精度に自然環境そのものを評価できるので、様々な環境に対する評価が可能となる。

#### 【0104】

本実施形態に係る環境評価方法では、このようにして得られた検体及び対照区で飼育した検体のそれぞれから試料を作製し、検体中のビテロジェニン量を測定、対照区と比較することで対象物質の内分泌攪乱作用や化学物質の毒性を判断することができる。すなわち、評価対象となる化学物質（例えばビスフェノールA、フタル酸エステル等）の存在下で雄のカエルを飼育し、経時的に血漿中のビテロジェニン量を測定し、対照区のカエルから得られた血清中のビテロジェニン量と比較する。その結果、実験区の両生類から得られたビテロジェニン量が対照区の量と比較して高い場合は、評価対象となる化学物質が内分泌攪乱作用を有すると判断される。あるいは、雄のカエルを、基準となるエストロジェンと評価対象となる化学物質との共存下で飼育した後、血液などを採取し、試料中に含まれるビテロジェニンを本発明の抗体と反応させてビテロジェニン量を測定し、得られ

た測定値の大小により、化学物質の毒性（例えば内分泌攪乱作用）を評価することができる。すなわち、評価対象となる化学物質の存在したで雄のカエルを飼育し、経時的に血清中のビテロジェニン量を測定し、対照区のカエルから得られた血清中のビテロジェニン量と比較する。その結果、実験区のカエルから得られたビテロジェニン量が対照区の量と比較して低い場合、評価対象となる化学物質は、内分泌攪乱作用を有すると判断される。

#### 【0105】

また、ある濃度のエストロジェン存在下で飼育したときのビテロジェニン濃度と、評価対象となる化学物質存在下で飼育したときのビテロジェニン濃度とを比較することにより、評価対象となる化学物質の内分泌攪乱作用の強度をエストロジェンと相対化して評価することが可能である。すなわち、ある濃度（例えば1.0 ppm）のエストロジェン存在下で飼育したときのビテロジェニン量が、内分泌攪乱作用の強度が不明であって、ある濃度（例えば0.1 ppm）の化学物質の存在下で飼育したときのビテロジェニン量と同じである場合は、当該化学物質の内分泌攪乱作用はエストロジェンに対して10倍強いと判断することができる。

#### 【0106】

また、当該評価方法によれば、評価対象となる河川や湖沼等に生息する雄のカエルの体液中のビテロジェニン量を測定することにより、内分泌攪乱作用を有する化学物質による環境の汚染状態を評価することも可能である。

#### 【0107】

次にカエルビテロジェニンのポリクローナル抗体について説明する。

#### 【0108】

上記カエルビテロジェニンのポリクローナル抗体は、従来公知の様々な方法のいずれかによって製造することができる（例えば Sambrook, J et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) を参照）が、以下に示すポリクローナル抗体の製造方法により製造された抗体が好ましい。以下、その製造方法に基づきこのポリクローナル抗体の説明をして行く。

## 【0109】

哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギ等にカエルビテロジェニン抗原として投与し、免疫する。抗原の動物1匹当りの投与量は、例えばアジュバントを用いるときは500～1000 $\mu$ gである。アジュバントとしてはフロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等があげられる。免疫は、主として皮下注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは初回免疫から3週間後に、2週間間隔で1～2回免疫を行う。そして、最終免疫日から5～20日後、好ましくは7～14日後に抗血清を採取する。次いで、得られた抗血清から硫酸分画法およびDEAE-セファデックスカラムクロマトグラフィーによりIgGを得る。

## 【0110】

ここで、ビテロジェニン特異抗体を得るためにはカエル血清タンパク質と結合した吸着カラムを用いて吸着精製させ、更にカエルビテロジェニンと結合したカラムを用いてアフィニティ精製することが望ましい。

## 【0111】

このように、単に抗血清よりIgGを単離するだけでなく、アフィニティ精製することにより、ポリクローナル抗体の特異性と感度向上が可能となる。

## 【0112】

本実施形態に係るビテロジェニンの製造方法では、カエル体内でビテロジェニンの合成誘導を行い、前記カエルから血液を採取して上清を採取し、前記上清を分離精製するようになっている。ここで、上清の分離精製方法としては、遠心分離や、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより、効率良く、且つ精度良くビテロジェニンを製造することができる。

## 【0113】

## 【実施例】

以下、実施例を用いて本発明を詳細に説明する。ただし、本発明がこれに限定されないことは言うまでもない。

<実施例1. アフリカツメガエルを用いたビテロジェニンアッセイ法>

(1) 装置: タンパク精製システム、マイクロプレートリーダー (東ソー社製)

(2) 材料: アフリカツメガエル雄成体

17 $\beta$ -エストラジオール: CAS No. : 50-28-2、分子式、分子量  
: 272.4

Lot No. : 19C-0519 (入手先: SIGMA)

抗ビテロジェニンウサギ抗血清: 1979年に作成され-80℃保存していたものを用いた

### (3) ビテロジェニン抗原の製造例

ビテロジェニンタンパク質を得るために、アフリカツメガエル成体雄に10 mg/ml 17 $\beta$ -エストラジオール (以下E2ともいう) を含むプロピレングリコール溶液を30  $\mu$ g/g BW (Body Weight) の濃度で注射し、ビテロジェニンの合成誘導をおこなった。8日間の飼育後に採取した血液を凝固させ、4℃、15000 rpmで5分間遠心し、上清 (血清) を採取した。この血清サンプル1/mlずつを陰イオン交換クロマトグラフィーシステム (QAE-Sephadex、Bio-Radエコノシステム) で分離精製し、ビテロジェニン標品を得た。BSA (牛血清アルブミン) を標準タンパク質としてBCA試薬により定量し、0.5 mg/mlの50%グリセロールPBS溶液として、-20℃で保存した。これを以下の実験の標準ビテロジェニン溶液として用いた。

### (4) ビテロジェニン抗体の製造例

-80℃凍結保存の抗ビテロジェニンウサギ抗血清10/mlから、硫酸分画によりIgG抗体を回収した。ビテロジェニンに対する抗体の純化のため、回収したIgG抗体液を、アフリカツメガエル正常雄血清を結合させたSepharose 4B吸着カラムで精製した。また、精製したビテロジェニン結合Sepharose 4Bカラムによってアフィニティ精製を行った。標識抗体作製のため、精製抗体に過ヨウ素酸酸化法により西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を共有結合させた (HRP標識ポリクローナル抗体)。

### 【0114】

以上のようにして、吸収精製ポリクローナル抗体およびアフィニティ精製HR



P 標識ポリクローナル抗体の2種類を、以下の実験の抗体溶液として用いた。

#### 【0115】

##### (5) ウェスタンブロッティングによるビテロジェニン検出法 (比較例)

SDS-7.5%アクリルアミドゲルを作成し、上述したようにE2を注射により投与したアフリカツメガエル成体雄血清および正常雄血清をそれぞれ0.05  $\mu$ lと、精製ビテロジェニン抗原7.5-750 ng範囲の希釈系列を電気泳動し、ゲル中の分離タンパク質をセミドライ法によりメンブレンにブロッティングした。ビテロジェニンポリクローナル抗体1  $\mu$ g/mlで免疫反応を行ったのち、HRP標識抗ウサギIgGヤギ抗体と反応させ、化学蛍光発色法によりビテロジェニンをX線フィルム上で検出した。これにより、抗体の特異性およびウェスタンブロッティングによる検出感度を検証した。

#### 【0116】

##### (6) ELISAによるビテロジェニン検出法

ELISAによるビテロジェニンの検出はa) サンドイッチ法、b) 拮抗法の2種類で行い、精製したビテロジェニン標品の希釈系列を用いて検出感度を比較検討した。

#### 【0117】

それぞれの検出手順は、予備実験ののち下記の通りに設定した。

#### 【0118】

##### 実施例1a: 拮抗法

##### 1. ビテロジェニン抗原の固相化

PBSで希釈した5  $\mu$ g/mlの標準ビテロジェニンを50  $\mu$ lずつマイクロプレートに分注し37℃で2時間インキュベートする

1. プレート洗浄 (0.1% Tween 20-PBS)

2. プレートのブロッキング (0.5% I-Block、0.1% Tween 20-PBS)

3. HRP標識ポリクローナル抗体に対する抗原の拮抗反応

別のプレート上で、抗原30  $\mu$ lと1  $\mu$ g/ml HRP標識ポリクローナル抗体30  $\mu$ l (ブロッキング液希釈) を混合し、1時間室温でインキュベートする

4. 固相化プレートの洗浄 (0.1% Tween 20-PBS)

5. 固相化抗原への抗体結合反応

4. の混合液 50  $\mu$ l を固相化プレートに移し、1 時間室温でインキュベートする

6. プレート洗浄 (0.1% Tween 20-PBS)

7. 発色基質 ABTS を用いたペルオキシダーゼ反応

8. プレートリーダーによる 405 nm の吸光度測定

実施例 1b: サンドイッチ法

1. ビテロジェニン抗体の固相化

PBS で希釈した 51  $\mu$ g/ml の抗ビテロジェニン抗体を 50  $\mu$ l ずつマイクロプレートに分注し 4  $^{\circ}$ C で一晩インキュベートする

2. プレート洗浄 (0.1% Tween 20-PBS)

3. プレートのブロッキング (0.5% I-Block、0.1% Tween 20-PBS)

検体あるいは標準抗原と固相化抗体の反応: 室温 2 時間、抗原はブロッキング液で希釈する。

4. プレート洗浄 (0.1% Tween 20-PBS)

5. HRP 標識ビテロジェニンポリクローナル抗体との反応

ブロッキング液で希釈した 2  $\mu$ g/ml の HRP 標識抗ビテロジェニン抗体を 50  $\mu$ l 加え、室温 1 時間インキュベートする。

6. プレート洗浄 (0.1% Tween 20-PBS)

7. 発色基質 ABTS を用いたペルオキシダーゼ反応

8. プレートリーダーによる 405 nm の吸光度測定

(8) 実験結果

○ポリクローナル抗体の特異性

E2 を注射したアフリカツメガエル成体雄の血清、および正常成体雄の血清を用いてウェスタンブロッティングを行い、本抗体による免疫染色を行った。精製前の抗体を用いると、それぞれの血清に共通するタンパク質が検出された(図 6-A)。一回の吸収カラム精製により抗体のビテロジェニンに対する特異性が高まり

、正常成体雄の血清タンパク質とは免疫反応を示さなくなった(図6-B)。

#### ○ELISAの検出感度

本抗体を用いたビテロジェニン検出方法において、ELISA拮抗法、ELISAサンドイッチ法、ウェスタンブロット法の3つについて、現在用いている条件設定での検出感度を比較した。

#### 【0119】

ELISAによる二つの方法について、標準ビテロジェニン濃度を0.1~4000 ng/mlの範囲で設定し、検出感度を検証したところ、拮抗法では最低検出限界(3SD)が20 ng/ml程度(図7-A)であったのに対し、サンドイッチ法では最低検出限界(3SD)が3 ng/ml程度(図7-B)となり、低濃度側のビテロジェニンを検出するためにはサンドイッチ法がより検出感度が高いことを示す結果となった。ただし、直線性を示す定量限界は30 ng/ml程度であった。

#### 【0120】

また、比較例としてビテロジェニン量を7.5~750 ngの範囲に設定し、ウェスタンブロッティングにより検出した結果、10 ng程度で検出可能であった(図8)。

#### (8) 考察

環境物質のビテロジェニン合成への影響評価を行うには、雄成体内で合成されたビテロジェニンをできるだけ低濃度で検出できる測定法が必要であると考えられる。そのため以下の検討を行った。

#### 【0121】

凍結保存されていた抗血清を、正常雄血清タンパク質結合カラムで吸収操作を施すことにより、ビテロジェニンに対する特異性が格段に上昇した。特異性をあげることは、低濃度のビテロジェニン検出に有効であると考えられる。

#### 【0122】

2種のELISA検出方法による感度の違いを抗原の最低検出濃度で比較した。ELISA拮抗法では20 ng/ml程度であったのに対し、ELISAサンドイッチ法では3 ng/ml程度であった。拮抗法では、低濃度側での測定値の

ばらつきが大きく、サンドイッチ法では少ないので、サンドイッチ法がより低濃度抗原の検出に有効であった。また、抗体の固相化を十分に行うことにより抗原と抗体との衝突頻度を高めることが好感度化には有効であると考えられ、プレートに薬品処理を施す等抗体の固相化効率を上げることが有効であると思われる。

### 【0123】

また、比較例としてウェスタンブロッティングの検出感度を検討した。その結果、約10 ng以上で定量的に検出された。ウェスタンブロッティングはELISA法より検出感度が低い傾向があり、操作が煩雑で検出に時間がかかるが、抗原を定性的に確認することができるという利点がある。ビテロジェニン分解されやすく、同法では分解産物を検出できない可能性もあり、ELISAとウェスタンブロッティングの両方法を組み合わせることで、ビテロジェニン合成への環境物質の影響を正しく評価することができると考えられる。

### 【0124】

#### <実施例2. アフリカツメガエルビテロジェニンアッセイ>

##### 実施例2-1: 曝露試験方法の比較

曝露試験は飼育水へのE2の添加および、個体へのE2の注入の2種類の方法で行い比較検討した。

##### 1) 材料と曝露方法

###### A. 水中曝露方法

同一年齢(二歳半)の成熟雄アフリカツメガエルを用い、20Lの脱塩素水道水にDMSOに溶かしたE2を添加したもの(実験群)および脱塩素水道水に溶媒であるDMSOを同量添加したもの(対照群)を充填したガラス水槽内で5匹ずつ飼育することにより実施した。E2の曝露濃度は0.1 nM、1 nM、10 nM、100 nM、1000 nMの5段階で実施し、7日間の飼育の間、3.5日目に1回飼育水の交換を行った。水温は22℃、明暗期ともに12時間に設定するとともに、試験期間内は給餌を行わなかった。

###### B. 注射法

Aと同一年齢の成熟雄アフリカツメガエルを用い、E2溶液を注射により注入したもの(実験群)および溶媒としたプロピレングリコールを約200 μl注射

により注入したもの（対照群）を20Lの脱塩素水道水を充填したガラス水槽内で5匹ずつ飼育することにより実施した。E2の曝露濃度は $0.002 \mu\text{g/g BW}$ 、 $0.02 \mu\text{g/g BW}$ 、 $0.2 \mu\text{g/g BW}$ 、 $2 \mu\text{g/g BW}$ 、 $20 \mu\text{g/g BW}$ の5段階で実施し、7日間の飼育の間に1回（3.5日目）再注入を行った。水温は $22^{\circ}\text{C}$ 、明暗期ともに12時間に設定するとともに、試験期間内は給餌を行わなかった。

#### 【0125】

なお、注射に際しては各個体について体重を測定し、設定濃度になるように $200 \mu\text{l}$ 前後のE2溶液を注射した。

#### 2) 検体採取方法

ビテロジェニンの検出は、血漿試料および肝臓ホモジネート試料の2種類の試料を用いて行い、比較検討した。

##### A. 血漿の採取

1. カエル腹腔へ麻酔薬（ $20 \text{mg/ml aminobenzoic acid ethyl ester}$ ）を $0.5 \sim 1.0 \text{ml}$ 注射する。

#### 【0126】

2. 開腹し、拍動する心臓から注射器で血液を $0.2 \text{ml}$ 、チューブに採取し氷上に置く

3.  $15000 \text{rpm}$ 、10分、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心し、上清の血漿を採る

4.  $2.0 \text{mM EDTA}-0.2\% \text{ Tween } 20-\text{PBS}$ 溶液で10倍希釈して冷蔵保存（長期保存の場合は冷凍保存）

希釈試料はELISAサンドイッチ法でビテロジェニンを定量した

##### B. 肝臓ホモジネートの採取

1. 上記採血後に肝臓片を $0.05 \sim 0.1 \text{g}$ 程度切り取り、重さを測る

2. 肝臓片を入れたチューブに、 $20 \text{mM EDTA}-0.5\% \text{ Tween } 20-\text{PBS}$ 溶液を $1 \text{ml}$ 加える

3. 氷上で肝臓をホモジナイズする

4.  $15000 \text{rpm}$ 、10分、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心し、上清を採り、冷蔵保存する（長期保存の場合は冷凍保存）

希釈試料はELISAサンドイッチ法でビテロジェニンを定量した

### 3) 結果と考察

水中曝露法では10 nMから応答が見られ、100 nMで明らかに上昇した(図9)。1000 nMで合成が増加しないのは、1000 nMより低濃度で合成が最大になるという培養肝細胞の知見と一致する。水中曝露法の場合は、今回7日間の曝露としたが、曝露期間については、検討する必要がある。また、今回は10倍の濃度変化で試験を行ったが1 nM前後の濃度依存的な応答を認めるためには、使用濃度を細かく設定し、多数の個体を用いた曝露実験が必要であると考えられる。

また、注射法では体重あたり0.02  $\mu$ g投与から応答が見られ、その後投与量依存的に増加した(図10)。水中曝露法と注射法とを直接比較することはできないが、注射法では広範囲で投与量依存性を認めた。逆に水中曝露法では10~100 nMでの急激な上昇が見られた。注射法では投与されたE2が個体内にどのように拡散するか不明であるが、もし個体内に均一に分散したとすると、ここで用いた投与量は体内で7.3 nM~73  $\mu$ Mに相当する。一方水中曝露法ではビテロジェニン産生量は100 nMで約13000  $\mu$ g/mlであり、注射法による73 nMでは約14000  $\mu$ g/mlであった。このことは水中曝露法の方が格段に低濃度でエストロゲン作用を検出できることを示す。注射法では、注射されたE2の一部しか体内では作用していないことが考えられる。なお、定量したビテロジェニン濃度を対数で示すことにより、より低濃度側でのE2濃度依存的な影響を視覚的に表すことができた(図9及び10右グラフ)。

検体採取方法の検討では、肝臓ホモジネートを用いると、血漿を用いたときよりもビテロジェニン測定値が低く出る傾向が見られ、バラツキが大きい。応答曲線のパターンはほぼ同一と言える。したがって、採血可能な成体を用いるときには血漿を利用した方が良好な結果を得られると考えられるが、幼生など小さい個体を用いるときには肝臓ホモジネートの利用も有効であることが示された。

### 【0127】

実施例2-2: 初代培養肝細胞を用いた試験

#### 1) 材料と方法

# A: 薬品

○10×灌流液 (0.14% KCl、5.5% NaCl、0.44% pyruvate、1% glucose E238% HEPES、5% BSA、0.2% NaHCO<sub>3</sub>)

○コラゲナーゼ灌流液 (1×灌流液をフェノールレッドでpH7.2~7.5にあわせ、0.1%コラゲナーゼ溶液とする。ろ過滅菌)

○培養液 (50% L-15、1.μg/ml インスリン、0.5% グルコース、antibiotics)

# B: 肝細胞採取方法

1. カエルを過マンガン酸カリウム (5mg/ml) の中で2時間以上消毒する (表皮が褐色になる)

2. 腹腔へ麻酔薬 (20mg/ml -aminobenzoic acid ethylester) を0.5~1.0/ml注射する

3. 腹側皮膚をアルコール棉でよく消毒し、開腹する

4. 心臓を露出させ、心室から注射針を差込み、肝静脈を通してコラゲナーゼ灌流液をペリスタポンプで送り込んで肝臓を灌流する

5. 肝臓を取り出しビーカーに移し、はさみで細かく切る

6. 少量のコラゲナーゼ灌流液とともにL型チューブに移す

7. 24℃のインキュベータで30~60分震盪する

8. ピペットでよく懸濁し、ナイロン網を通してろ過する

9. 培養液を少量加え、300rpmで1~2分間遠心する

10. 遠心上清を吸引除去し、培養液を加え再度遠心する (この操作を2回繰り返す)

11. 細胞濃度を血球計測板で測定し、1/mlあたり10万~20万個まで希釈する

12. マイクロプレートに100~300μlずつ蒔く (2万個/well程度がよい)

13. 24℃インキュベータ中で培養する

# C: 試験方法

培養液中に試験物質を加えて培養する方法で処理を行う。

#### 【0128】

培養1日目くらいから肝細胞は機能回復し、細胞のプレートへの接着・伸展がおこるため、培養2日目あたりから試験物質を含む培養液に交換し、7日目の培養液を採取してELISA法によるビテロジェニン検出に用いる。培養液は3日に一回交換する（多く細胞を蒔きすぎると交換を頻繁に行わなければいけない）。E2処理の場合、処理3日目あたりから培養液中のビテロジェニンを検出することができることが知られているが、生着した培養肝細胞は3週間は安定しているため、作用性の低い物質の試験にはより長期間のアッセイをおこなう。

#### 2) 結果と考察

培養肝細胞を用いたアッセイの場合、E2 0.6 nM以上の曝露濃度で、濃度に依存して有意なビテロジェニン濃度の増加が認められた(図11)。また、個体を用いる場合より測定値のバラツキが少なく、再現性が高い。特に、個体を用いた水中曝露実験よりも低濃度側でのE2濃度依存的なビテロジェニン合成が認められた。

#### 【0129】

その他、培養肝細胞を用いる利点としては、

- ・多数の試料を一度に検定でき、経済的である。
- ・分泌蛋白質なので培養液をそのまま検定に使用すれば良く、迅速かつ簡便である。
- ・生体内のホルモン等に影響されず、肝細胞の応答が直接検定できる。
- ・厳密な曝露条件設定が可能である。
- ・検出システムをマニュアル化でき、特別な技能を要さない。

等が挙げられる。

#### 【0130】

##### 【発明の効果】

以上説明したように、本発明の検出キット、検出方法及び環境の評価方法によれば、カエルのビテロジェニンを感度、精度ともに良好に検出することが可能となり、それにより環境中の内分泌攪乱化学物質の影響を網羅的に評価することが



可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の検出キット全体を示す模式図である。

【図 2】

本発明の検出キットの測定プレートの全体模式図である。

【図 3】

本発明の検出キットのサンドイッチ法に係る測定プレートの穴の部分断面図である。

【図 4】

本発明の検出キットの拮抗法に係る測定プレートの穴の部分断面図である。

【図 5】

本発明の検出方法における拮抗法を説明する工程図である。

【図 6】

本発明の検出方法におけるサンドイッチ法を説明する工程図である。

【図 7】

本発明のビテロジェニン抗体の特異性を示す画像である。

【図 8】

本発明の検出方法におけるビテロジェニンの検出感度を示すグラフである。

【図 9】

比較例のウェスタンブロッティングにおけるビテロジェニンの検出を示すグラフ及び画像である。

【図 10】

本発明の環境評価方法の水中曝露におけるビテロジェニンの合成誘導を示すグラフである。

【図 11】

本発明の環境評価方法の直接注入におけるビテロジェニンの合成誘導を示すグラフである。

【図 12】

培養肝細胞を使ったビテロジェニン合成誘導を示すグラフである。

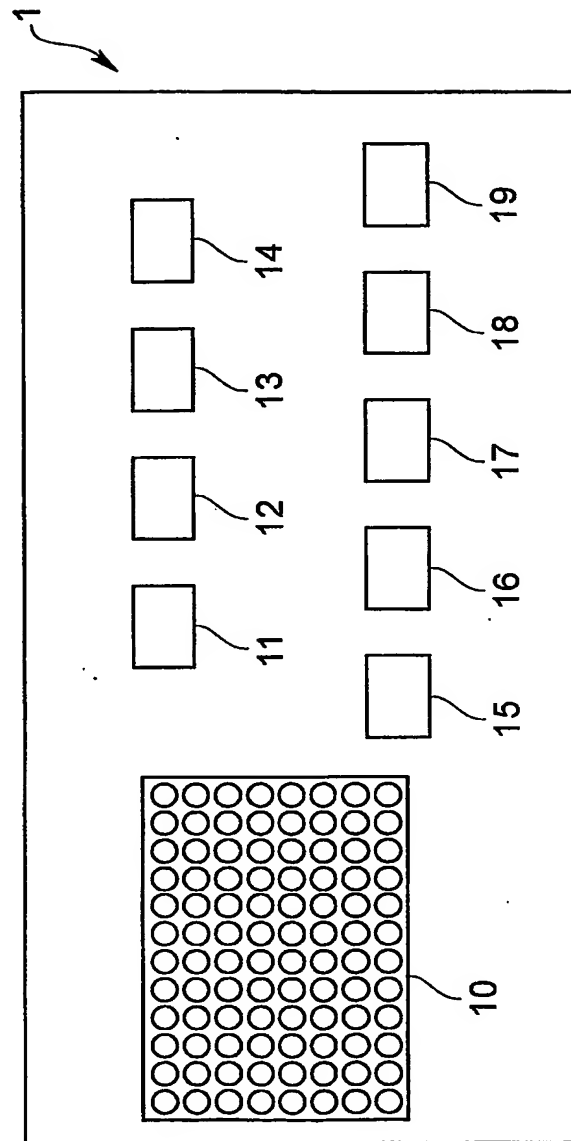
【符号の説明】

- 1…検出キット
- 10…プレート
- 11…標品ビテロジェニン
- 12…1次抗体
- 13…2次抗体
- 101…穴
- 111…抗体

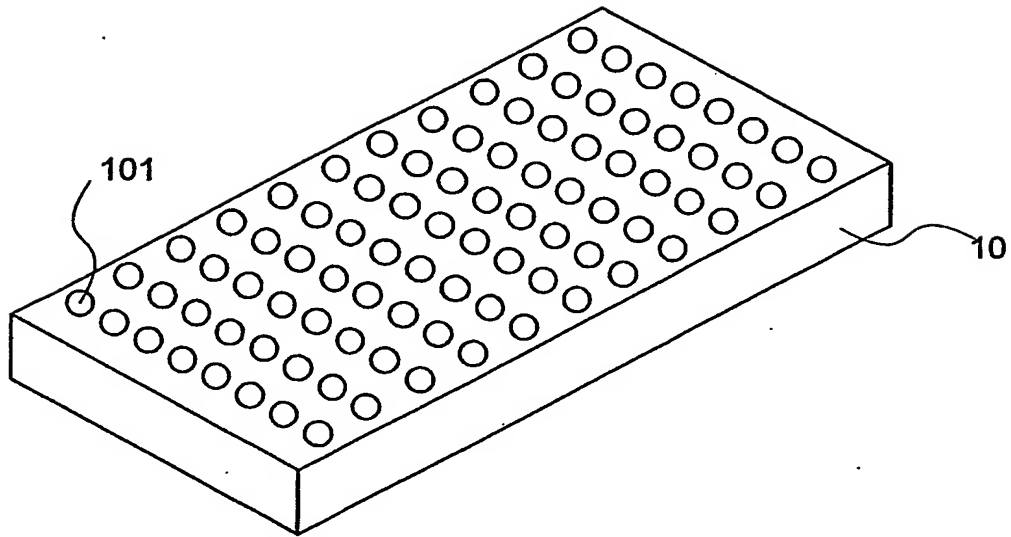
【書類名】

図面

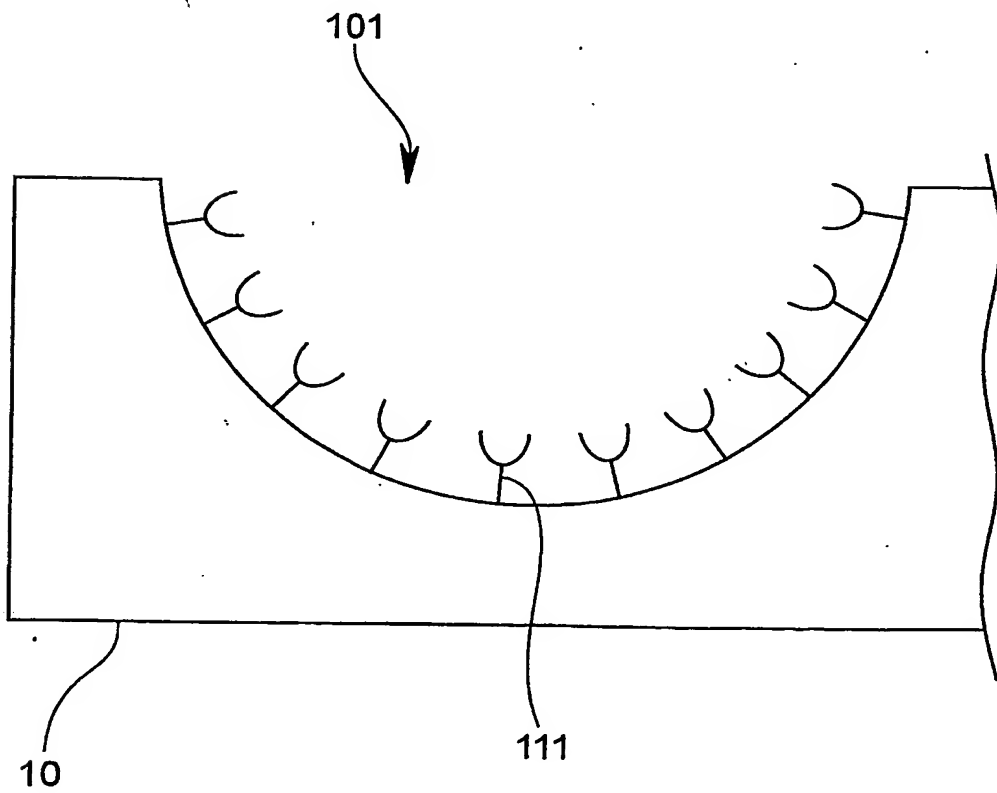
【図 1】



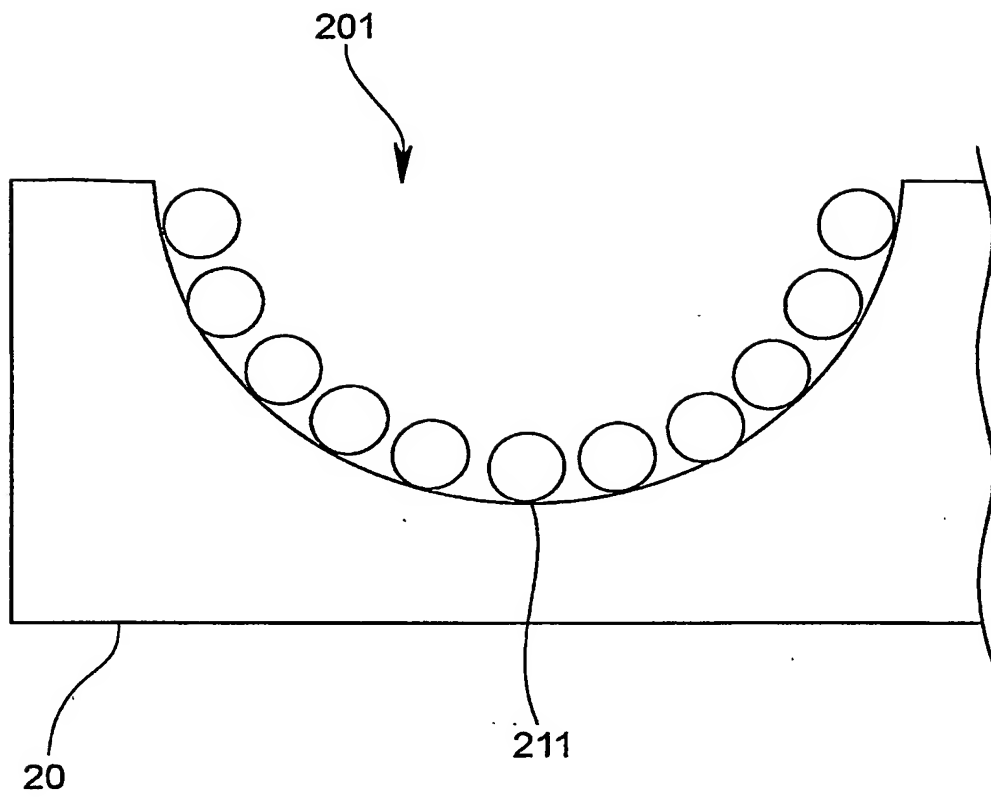
【図 2】



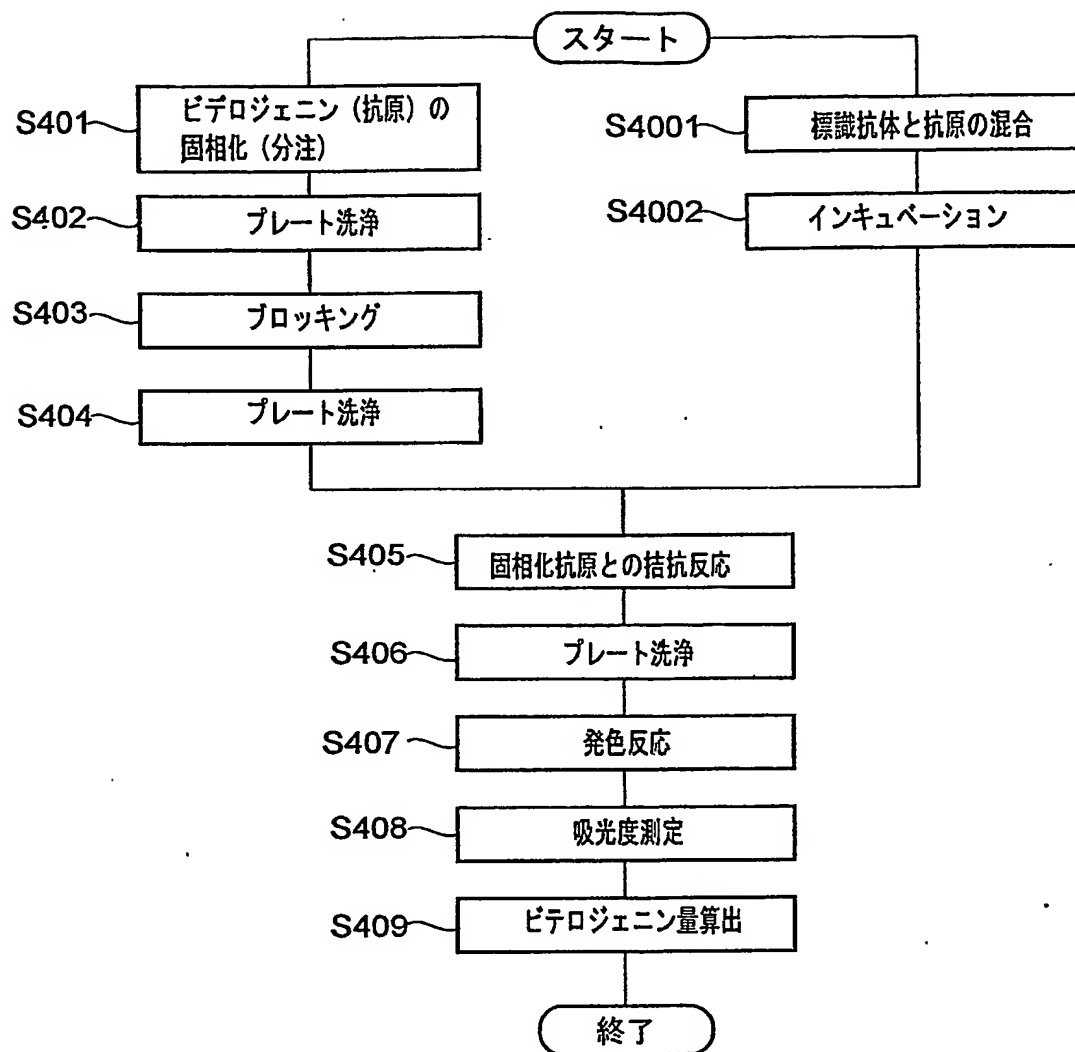
【図 3】



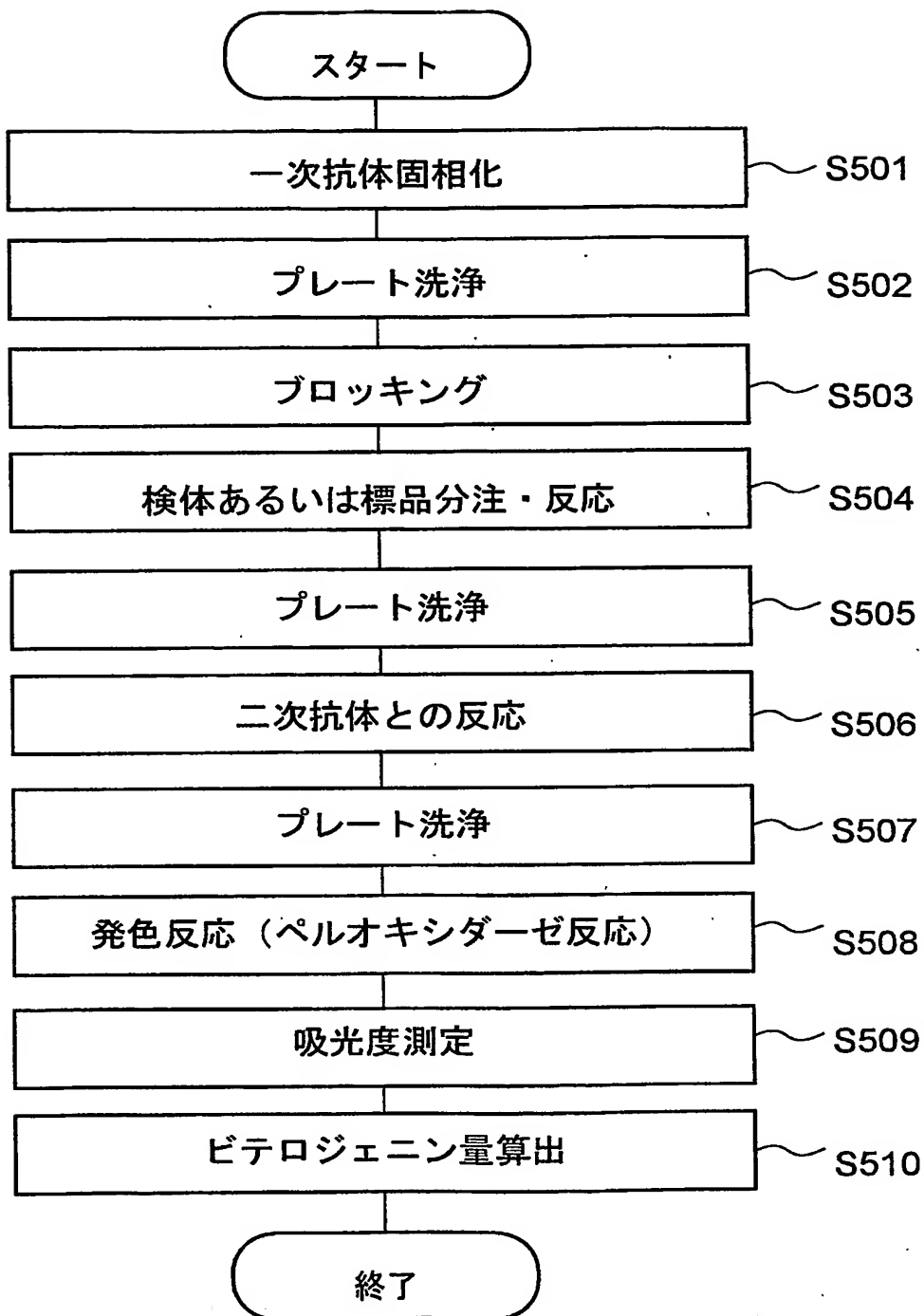
【図 4】



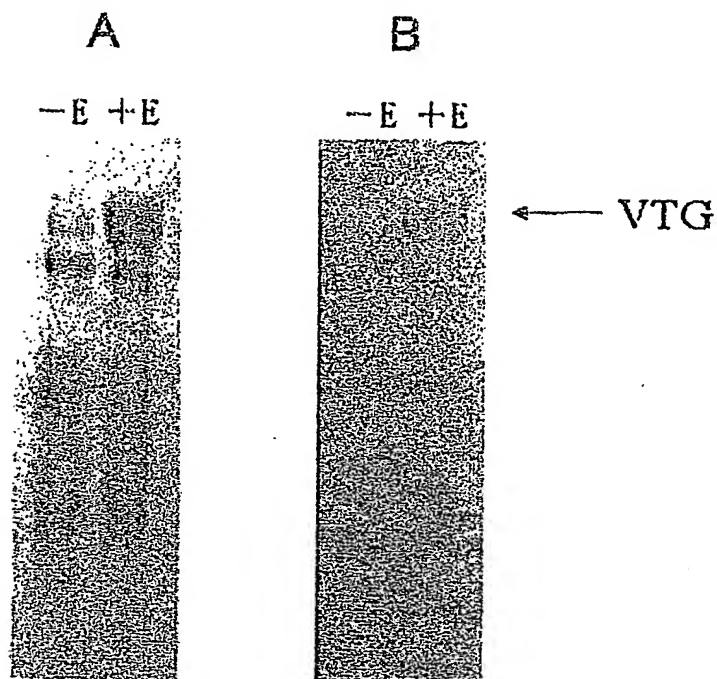
【図 5】



【図 6】



【図 7】



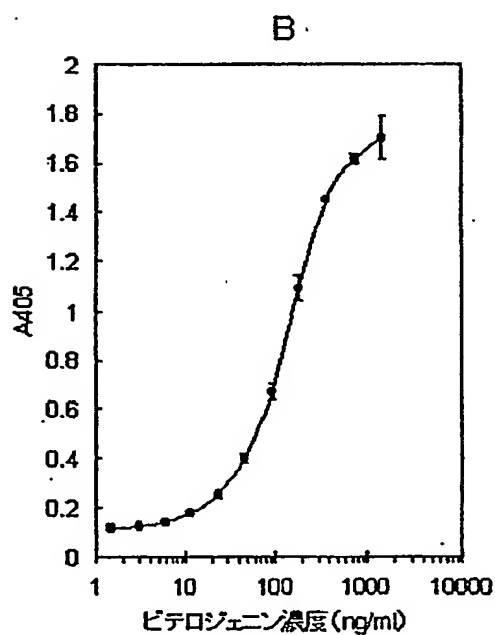
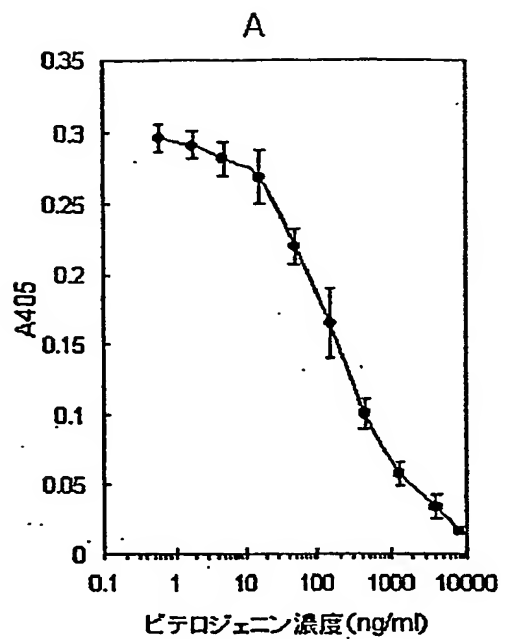
ビテロジェニン抗体の特異性

A: 精製前抗体    -E: 正常雄血清  
B: 精製後抗体    +E: E2処理雄血清

BEST AVAILABLE COPY



【図8】

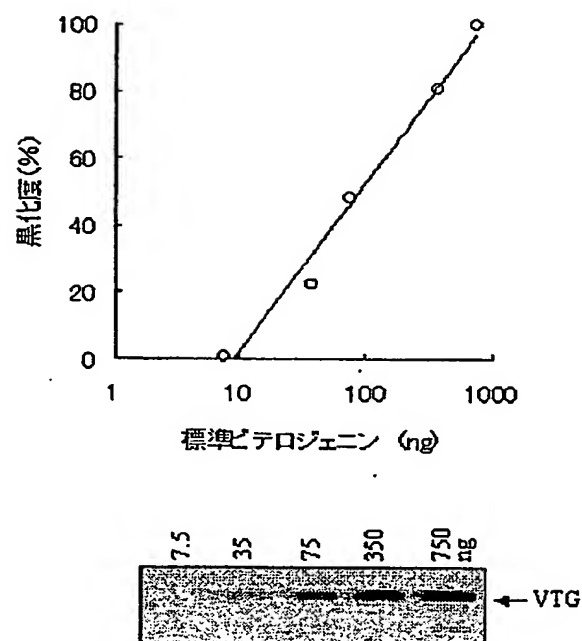


ELISAによる標準ピテロジェニンの検出感度

A: 拮抗法

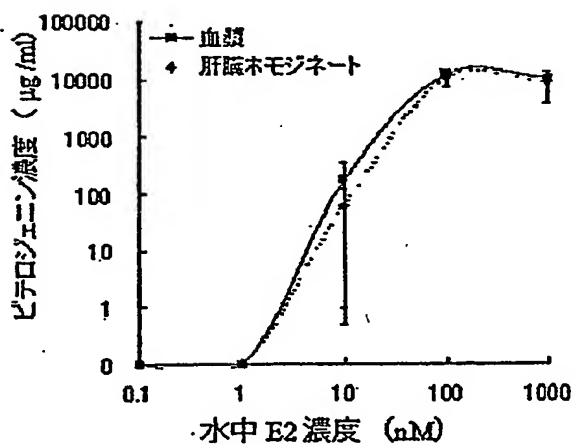
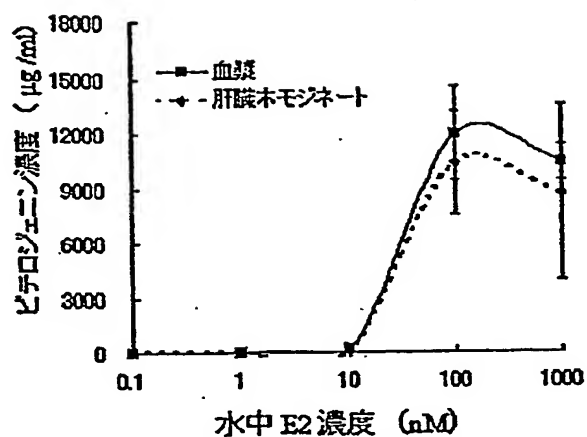
B: サンドイッチ法

【図 9】



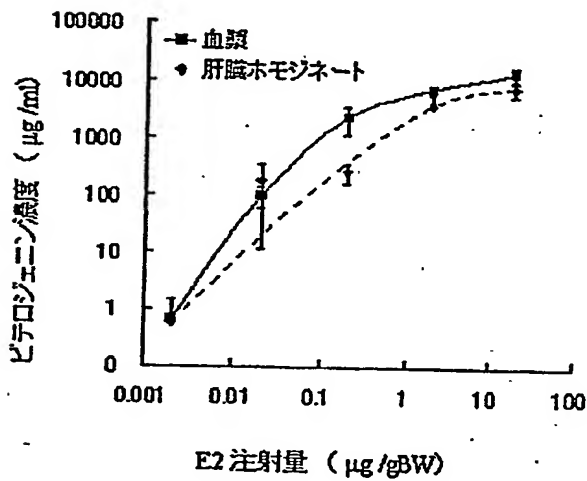
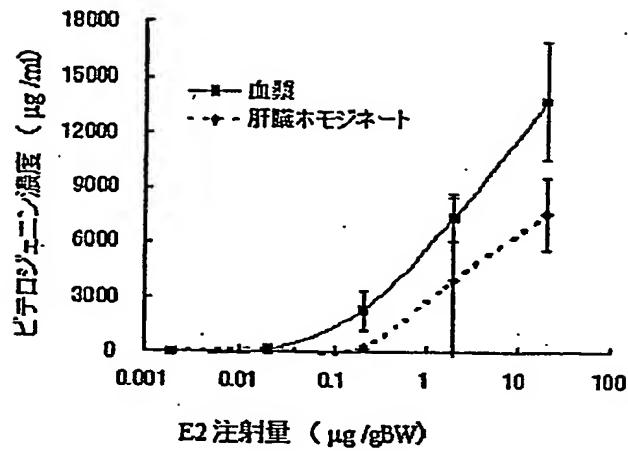
ウェスタンブロッティングによる標準ビテロジェニンの検出

【図10】



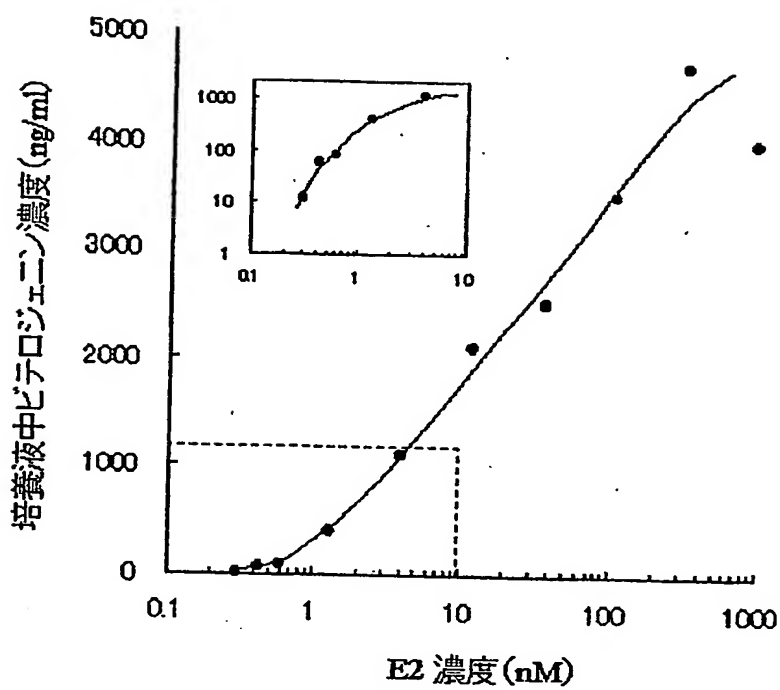
E2 水中曝露によるピテロジェニンの合成誘導

【図11】



E2 注射によるピテロジェニンの合成誘導

【図12】



・ E2 による培養肝細胞のビテロジェニン合成誘導

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 カエルビテロジェニンを精度良く検出し、信頼性の高い環境評価を行うことを可能とする技術を提供すること。

【解決手段】 予めプレート10に設けられた穴101の表面にビテロジェニンを認識する1次抗体12を固相化し、該穴101に環境に曝露された検体から得られた試料を注入して反応させた後、酵素により標識され、前記ビテロジェニンを認識する2次抗体13を注入して反応させ、次いで発色剤16を注入することにより発色反応させて該発色量を測定し、その発色量からビテロジェニン量を算出し、該ビテロジェニン量に基づいて環境を評価する。

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-167920
受付番号	50200834109
書類名	特許願
担当官	第五担当上席
作成日	平成14年 6月17日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 6月 7日

次頁無

特願2002-167920

出願人履歷情報

識別番号

[000223104]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住 所  
氏 名

1990年 8月 6日

新規登録

広島県広島市中区舟入町6番5号

東和科学株式会社